

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO INSETICIDA
METHYL PARATHION NO PACU (*Piaractus
mesopotamicus* HOLMBERG, 1887)**

Maria Isabel Mataqueiro
Bióloga

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO INSETICIDA
METHYL PARATHION NO PACU (*Piaractus
mesopotamicus* HOLMBERG, 1887)**

MARIA ISABEL MATAQUEIRO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Aquicultura, área de Concentração: Aquicultura em Águas Continentais como parte das exigências para obtenção do título de mestre.

Jaboticabal – SP

Abril - 2002

*TODA a natureza é uma harmonia divina,
sinfonia maravilhosa que convida
todas as criaturas a que
acompanhem sua evolução
e progresso.*

*SEJA, em sua vida, um instrumento
apto a captar as
vibrações de paz e serenidade da
natureza, e sua saúde
encontrará o equilíbrio necessário
a prosperar cada vez mais.*

*VIVA de acordo com as leis da natureza,
e com o espírito voltado
Para DEUS*

(salmo 61 do livro Minutos de Sabedoria de C. Torres Pastorino)

DEDICO.....

A *DEUS* em primeiro lugar, pois é a Energia Cósmica universal, que habita dentro de nós e de tudo o que existe no universo infinito, dando-nos vida e força.

Aos meus queridos pais,

LUIZ E LUIZA

Exemplos de vida....

Sempre com muito amor e dedicação às filhas: Cidinha, Zezé Bel e netos (Michele, Raquel, Matheus, Agnaldo, Anselmo e Livia).

À minha querida filha,

LIVIA

que participou ativamente desse meu desafio;
sem ela, jamais atingirei o alto da montanha.....

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto pela orientação desta dissertação, pelo grande profissionalismo e pelas valiosas sugestões e interesse demonstrados durante o planejamento, execução e correção deste texto.

Ao Prof. Dr. Antonio de Queiroz Neto e Prof. Dr. Edanir dos Santos pela ajuda na realização de meu sonho profissional, bem como pelas suas sinceras amizades.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, que viabilizou meu crescimento profissional.

Aos professores, funcionários e alunos de pós-graduação do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Unesp- Jaboticabal pelo companheirismo e amizade demonstrados.

À Prof^a. Dr^a Elisabeth Criscuolo Urbinati e sua maravilhosa equipe (Ana, Antonio, Damares, Flávio, Fernanda, Janessa, Miguel e Richard) pela indispensável colaboração na condução do experimento.

Ao CPPAR, Mauricio, Prof. Dr. Flavio, Marcos Tavares, pelo auxílio prestado na condução do experimento.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros pela ajuda nas análises estatísticas. Ao Sr Orandi pela confecção das lâminas.

Ao CAUNESP pela doação de alevinos e peixes utilizados neste trabalho.

Aos meus amigos da terra (D.Santa, Sr. Nininho, Cidinha, José Edson, Periquito, Pelé, Má, Mário), aos argentinos (Carol Enrique) e aos Gaúchos (Alex, Bete, Ricardo, Lú, família Zanella) pela amizade e pelos momentos compartilhados.

A todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, com maior ou menor intensidade: Auta, Caio, Carlos (Marília), Carolina, Claudinha, Claudinei, D. Ana, Dionísio, Erlei, Fátima, Fernando, Flora, Gilson, Glaucia, Hugo, Juliana, Marcio, Mauro, Mônica, Nilton, Renata (H.V.), Roberto, Rossineide, Suerly, Tiêko (Biblioteca), Valéria, Wando, Veralice e Waldecir e todas as pessoas que porventura não foram citadas.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1	3
CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
1- IMPORTÂNCIA DO TEMA.....	3
2- USO DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS EM AMBIENTE AQUÁTICO E EM PISCICULTURA.....	4
3- MODO DE AÇÃO E EFEITOS AGUDOS E SUB AGUDOS DO METHYL PARATHION EM PEIXES	6
4- BIBLIOGRAFIA	9
CAPÍTULO 2	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Condições laboratoriais do teste	16
Organismos-teste.....	16
Inseticida testado	16
Substrato utilizado.....	17
Procedimento para realização dos testes	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4. CONCLUSÃO	19
5. ABSTRACT	19
6. BIBLIOGRAFIA.....	20
CAPÍTULO 3	22
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ABSTRACT	34
ANEXOS	36
ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA CEPPA.....	36
ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA BULLETIN OF ENVIRONMENTAL	39
CONTAMINATION AND TOXICOLOGY	39

APRESENTAÇÃO

A maneira de exposição dos capítulos foi feita com o objetivo de encaminhamento dos artigos para publicação em revistas científicas, o que facilita e agiliza o processo de publicação dos resultados científicos.

O capítulo 1 contém uma abordagem geral sobre o uso dos agrotóxicos na agropecuária e nas proximidades de áreas alagáveis, onde poderão atingir e causar intoxicação em muitas espécies não-alvo, incluindo peixes. Esse capítulo também contém informações sobre o uso dos organofosforados em tanques de piscicultura para eliminar larvas de insetos aquáticos predadores de larvas de peixes.

No capítulo 2 encontra-se o trabalho de avaliação da toxicidade aguda, contendo o cálculo da CL_{50-96h} de methyl parathion para alevinos de pacu e os parâmetros físico-químicos da água. Os valores calculados de CL_{50-96h} do methyl parathion para os alevinos foram utilizados na definição das doses subletais do inseticida testadas no experimento apresentado no capítulo 3.

No capítulo 3 relata-se o experimento realizado no Laboratório do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) – Unesp - Jaboticabal. Foram avaliados variáveis hematológicas, hormonal, bioquímicas e biométricas em pacu exposto ao inseticida methyl parathion em diferentes concentrações.

CAPÍTULO 1

Considerações Gerais

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1- Importância do tema

Devido ao crescimento populacional, há necessidade cada vez maior de produção de alimentos através da intensificação das atividades de pecuária e agricultura o que leva ao aumento da utilização de agrotóxicos. Estes evitam as perdas que poderiam ser causadas pelas pragas nas produções de alimentos. Uma vez aplicados, os agrotóxicos podem contaminar todos os componentes bióticos e abióticos, como as plantas, o solo, a rede hidrográfica local e atingir organismo não alvo, tais como peixes e outros.

A contaminação dos rios, represas e açudes com agrotóxicos utilizados na agricultura quase sempre ocorre devido ao carreamento pelas águas das chuvas, águas de irrigação ou erosão das partículas de solos tratados (CÁCERES et al., 1981 e AGUIAR e MORAES, 1999). A contaminação da rede hidrográfica ocorre normalmente porque está localizada na parte mais baixa do relevo e entremeada nas áreas agrícolas e pecuárias. A contaminação da rede hidrográfica também ocorre com a aplicação dos agrotóxicos diretamente na água, visando o controle de plantas, insetos e de parasitos de peixes em piscicultura.

Em piscicultura, as parasitoses que atacam os peixes, destacam-se como importantes redutores da produtividade, pois provocam atraso no crescimento dos mesmos e altas taxas de mortalidade (RANZANI-PAIVA et al., 1997). A suscetibilidade dos peixes aos parasitos e patógenos varia em função da espécie de peixe cultivada, de indivíduo para indivíduo e das condições ambientais existentes (KUBITZA e KUBITZA, 1999). De uma forma geral, a suscetibilidade aos parasitos e patógenos é maior em peixes mais jovens, em relação aos animais adultos e mal nutridos, ou que passaram por privação alimentar. Essa suscetibilidade também aumenta quando as condições de qualidade da água são inadequadas ou quando ficam expostas a substâncias tóxicas como inseticidas, produtos terapêuticos e profiláticos, usados pelos criadores, que podem causar alterações fisiológicas nos peixes (KUBITZA e KUBITZA, 1999).

O controle das parasitoses em piscicultura geralmente é feito com agrotóxicos aplicados sem orientação adequada e indiscriminadamente

(RANZANI-PAIVA et al., 1997 e RODRIGUES et al., 1997). A continuidade da rede hidrográfica possibilita a contaminação de diversos elos das cadeias tróficas aquáticas, levando à contaminação de animais mesmo longe dos focos de poluição (RODRIGUES et al., 1997 e FANTA, 1991).

A água constitui um dos elementos fundamentais para a sobrevivência dos organismos nos ecossistemas. Portanto, se ela estiver contaminada por agrotóxicos, pode-se considerar que todos os demais componentes do ecossistema, sejam eles bióticos ou abióticos, estarão contaminados, pois a água está presente em todas as partes (MACHADO NETO, 1991). Os agrotóxicos, presentes no meio aquático, podem atingir o homem pela ingestão de água e de alimentos contaminados, como os peixes. Os peixes entram em contato direto com os agrotóxicos principalmente pela via dérmica, superfície externa do corpo com suas inúmeras estruturas sensoriais e brânquias, e oral, em todo o trato gastrointestinal (FANTA, 1991).

As medidas preventivas e corretivas para a preservação e proteção da flora e da fauna aquáticas baseiam-se em estudos ecotoxicológicos, por meio dos quais são estabelecidos limites aceitáveis de poluentes na água (ZAGATTO e GOLDSTEIN, 1991). Esses estudos devem ser conduzidos para avaliar os efeitos tóxicos dos defensivos agrícolas utilizados em piscicultura sobre os peixes de cultivo, pois, além de controlarem os parasitos, estas substâncias podem causar efeitos tóxicos nos animais de produção.

2- Uso de inseticidas organofosforados em ambiente aquático e em piscicultura

O uso indiscriminado dos agrotóxicos para controlar as ectoparasitoses em piscicultura tem resultado em poluição ambiental, contaminação dos peixes de cultivo e de todos os organismos envolvidos na cadeia alimentar aquática (RANZANI- PAIVA et al., 1997 e RODRIGUES et al., 1997).

Os inseticidas organofosforados destacam-se como os agrotóxicos mais utilizados em piscicultura para o controle da ectoparasitoses. Entretanto, a aplicação destes inseticidas pode resultar em altos níveis de resíduos nos peixes, inclusive no momento do consumo, pois normalmente os períodos de carência não são respeitados pelos piscicultores (RODRIGUES et al., 1997). Além deste

aspecto, os inseticidas organofosforados podem causar efeitos tóxicos subagudos nos peixes, notadamente na morfologia e fisiologia dos animais.

Na aquicultura, os inseticidas organofosforados são utilizados em diversas oportunidades e etapas do processo para controlar Odonata, que é o principal inseto predador de peixes. Na prática de alevinagem em áreas tropicais e subtropicais, devido às condições ecológicas, há favorecimento do desenvolvimento temporário das Odonatas, que causam grande predação e mortalidade de alevinos (GÁRADI et al., 1988). O methyl parathion destaca-se como o inseticida mais empregado para combater os predadores aquáticos (FIGUEIREDO e SENHORINI, 1990), é também recomendado para o controle da tricodiniose, dactilogiridose e doenças causadas por crustáceos em peixes (ALEXANDRINO DE PEREZ, 1999). O tratamento dos peixes pode ser feito interna ou externamente. Quando o tratamento é feito de forma externa, pode-se utilizar a administração de inseticidas na água. Esse método é denominado de banho e pode ser de longa duração em recipiente de tratamento, onde os peixes são expostos ao inseticida até total renovação da água. O banho também pode ser de curta duração, onde os peixes são mantidos em uma solução tóxica na concentração recomendada por períodos de até 60 minutos.

Um tratamento muito empregado é o que se processa em tanques e viveiros de maiores dimensões e consiste em expor os peixes doentes à baixa concentração do inseticida por tempo indeterminado (ONO e KUBITZA, 1997). PAVANELLI et al. (1998) relatam que os banhos podem ser ministrados em períodos de curta duração e dentro de tanques ou recipientes pequenos e com volumes definidos. Os banhos também podem ser realizados nos próprios tanques de criação, onde a renovação da água é mínima e os peixes ficam submetidos à ação do inseticida por períodos prolongados (PAVANELLI et al. (1998).

JUAREZ e ROUSE (1983) e OPUSZYNSKY et al. (1984) citam que os inseticidas organofosforados são comumente utilizados na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixe, na concentração de 0,25 a 3,00 ppm do ingrediente ativo. Essas aplicações visam eliminar, temporariamente, os microcrustáceos cladóceros e copépodes e combater os predadores aquáticos e, com isso, maximizar a produção de rotíferos.

SENHORINI et al. (1991) relatam que o methyl parathion, produto comercial Folidol®, formulação concentrada emulsionável com 60% do ingrediente ativo, nas concentrações entre 0,25 ppm e 0,50 ppm, dizimou as populações de Odonata e Cladóceros, porém os copépodos permaneceram vivos. Segundo GÁRADI et al. (1988) o folidol elimina Odonatas na concentração de 0,5 ppm, mas não seleciona o zooplâncton.

3- Modo de ação e efeitos agudos e sub agudos do methyl parathion em peixes

O mecanismo de ação dos inseticidas organofosforados é a inibição da enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina, neurotransmissor químico dos impulsos nervosos nas sinapses das ligações entre os neurônios do sistema nervoso. As moléculas desses inseticidas se ligam na acetilcolinesterase por meio de ligação covalente (fosforilação) do grupo hidroxil da serina, presente no sítio esterásico da enzima, embora alguns organofosforados liguem-se em ambos os sítios ativos desta enzima (SPINOSA et al., 1996). Os inseticidas organofosforados tornam-se muito mais ativos e mais tóxicos após a biotransformação para a forma paraoxon. A inibição da enzima acetilcolinesterase por inseticidas organofosforados resulta em alterações das funções do sistema nervoso de peixes (AGUIAR e MORAES, 1999 e RAO e RAO, 1984). Em função da concentração na água, os inseticidas organofosforados causam intoxicações agudas e crônicas nos peixes.

A primeira ação de alerta aos possíveis problemas de poluição dos ambientes aquáticos consiste na realização de testes de toxicidade para a avaliação da qualidade da água (ZAGATTO e GOLDSTEIN, 1991). Os primeiros testes a serem realizados são os bioensaios para avaliação da toxicidade aguda dos poluentes, ou compostos químicos tóxicos na água, onde são calculados os valores de concentrações letais a 50% dos organismos expostos (CL₅₀).

O methyl parathion destaca-se como um dos inseticidas mais utilizados para o controle de insetos predadores e parasitoses em piscicultura, porém pode causar intoxicações agudas e subagudas nos peixes, inclusive nos cultivados. Em testes de toxicidade aguda de methyl parathion para peixes, foram calculados valores de CL₅₀ de 0,50 mg/L para *T. tubifex* (SUSEELA et al., 1994), 2,45 para

Clarias batrachus (TRIPATHI e SHUKLA, 1992) e 2,70 truta arco íris (TOMLIN, 1995).

Quanto aos efeitos subagudos, RAO e RAO (1984), após a exposição de *Tilapia mossambica* ao methyl parathion, verificaram que houve bloqueio na condução do impulso nervoso e diminuição da atividade da acetilcolinesterase em tecidos como músculo, brânquia, fígado e cérebro. Do mesmo modo, o methyl parathion causou inibição da acetilcolinesterase no cérebro, brânquia, fígado e músculos de peixes da espécie catfish (STRAUS e CHAMBERS, 1995).

SILVA et al. (1993) avaliaram os efeitos subletais do methyl parathion em peixes *Callichthys callichthys* expostos à aplicação de 500 mg/kg. Verificaram que em quatro horas de exposição, os níveis da atividade da enzima acetilcolinesterase plasmática foram inibidos em 90% por 4 dias. SUSEELA et al. (1994) observaram decréscimo nos teores protéicos, lipídicos e de carboidratos de *T. tubifex*. CUNHA-BASTOS et al. (1998) verificaram redução da atividade da paraoxonase em pacus mantidos em tanques com 0,25 ppm de methyl parathion na água.

HONTELA et al. (1993) relataram que a exposição a inseticidas de um modo geral, aumenta o nível de cortisol no sangue de peixes. Esses autores citam que mudanças na concentração de hormônios são indicadores do estresse tóxico em peixes, particularmente os que regulam as funções vitais tais como a osmorregulação, metabolismo energético, reprodução e crescimento. Porém, BARTON e IWAMA (1991) citam que algumas substâncias tóxicas (aldrin e anestésicos) prejudiciais à saúde dos peixes não provocam elevação no nível de cortisol plasmático, o que pode levar à conclusão equivocada de que não são agressores.

Apesar do benefício imediato dos organofosforados para a piscicultura, no controle dos parasitas em peixes, AGUIAR e MORAES (1999) concluíram que o methyl parathion causou efeito negativo no metabolismo energético de peixes da espécie *Brycon cephalus*.

RANZANI et al. (1997) diluíram o inseticida trichlorfon na água do aquário, e avaliaram os efeitos sobre os peixes em amostragens com 24, 48 e 72 horas de exposição ao inseticida. O sangue foi utilizado para determinações de número de eritrócitos, hematócrito, taxa de hemoglobina e contagem diferencial dos leucócitos. Verificaram como resultado uma diminuição da porcentagem de

linfócitos e monócitos e aumento das porcentagens de neutrófilos e células imaturas.

TAVARES-DIAS et al. (1999) avaliaram os parâmetros hematológicos no pacu após tratamento com organofosforado e observaram reduções no número de hemáceas e hemoglobinas no sangue. RODRIGUES et al. (1997) concluíram que mesmo utilizando dose subletal, o inseticida triclorfon causa visível prejuízo morfo-funcional no baço de *Prochilodus scrofa*, tais como núcleos picnóticos, focos de necrose e decréscimo significativo na quantidade de eritrócitos.

A glicose sangüínea e o glicogênio hepático são substratos metabólicos básicos e destacam-se como importantes parâmetros no estudo do metabolismo animal (LENINGHER, 1995). SRIVASTAVA e SINGH (1981) submeteram peixes à concentração subletal de 5,6 ppm de methyl parathion e verificaram que o nível do glicogênio do músculo diminuiu significativamente em 3, 6, 12, e 96 horas. O conteúdo do glicogênio do fígado diminuiu em 6 horas e o nível de glicose no sangue dos peixes foi elevado após 3 e 6 horas de exposição.

DOMITROVIC (1997) verificou que os inseticidas carbofuran, clordano, clorpirifos, cipermetrina e endossulfan, com valores de CL_{50} para peixes menores que 1 mg/L, causaram alterações histopatológicas nas brânquias, caracterizadas por hemorragia e edema, mas sem lesões necróticas no epitélio. Em alguns casos, ocorreu hiperplasia e hipertrofia epitelial transitória, com fusão leve das lamínulas. Todos os inseticidas acima causaram lesões necróticas e degenerativas no fígado dos peixes.

HEATH et al. (1993), estudando os efeitos de diversos agrotóxicos em uma espécie de pequenos peixes japoneses, observaram alterações significativas no modo de natação dos animais expostos a concentrações subletais entre 0,66 e 1800 µg de methyl parathion/L.

MARTINS (1998), avaliando a presença de resíduos de methyl parathion na carne de peixes cultivados, verificou que aos 8 dias após o tratamento, os peixes não apresentavam resíduos do produto na carne, mas apenas nas vísceras.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e os efeitos subagudos hematológicos, hormonal, bioquímicos e biométrico do inseticida methyl parathion em pacu.

4- Bibliografia

AGUIAR, L.H.; MORAES, G. Hepatic alanine and aspartic amino transferases of the freshwater teleost. *Brycon cephalus* (Matrinchã) exposed to the organophosphorous methyl parathion (folidol 600 registred). **Fish response-to-toxic-environments Kennedy**, Canadá. p.145 – 152, 1999.

ALEXANDRINO DE PÉREZ, A.C. Empreendimentos piscícolas e o médico veterinário. **Revista de Educação Continuada do CRMV – SP**, São Paulo, v.2, p. 43 –65, 1999.

BARTON, B; IWAMA, G. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Rev. of fish diseases**. USA, p.3-26, 1991.

CÁCERES, O. et al. Resíduos de pesticidas clorados em água das cidades de São Carlos e Araraquara. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.33, n.12, p.1622-6, 1981.

CUNHA-BASTOS, V.L.F. et al. Different sensitives to paraoxon of brain and serum cholinesterases from pacu, na indigenous Brazilian fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 60, n. 1, p. 1– 8, 1998.

DOMITROVIC, H.G. El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: evaluación de la especie *Aequidens portalegrensis* (Hensel, 1970). **Revista de Ictiologia**, Argentina v. 5, p. 37-42, 1997.

FANTA, E. Ação de poluentes sobre o tecido. In: Heid Sueli Leme dos Santos. **Histologia de peixes**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 80p.

FIGUEIREDO, G.M. de; SENHORINI, J.A. Influência de biocidas no desenvolvimento da carpa comum (*Cyprinus carpio* LINNAEUS, 1758) e sobre o

zooplâncton, durante o período de larvicultura. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.3, p. 5-21, 1990.

GARÁDI, P.; DOMARCO, R.C.; PINHEIRO, C.W.L. Avaliação do uso de inseticida (orgânicos fosforados) no combate às Odonatas e na seleção zooplanctônica em piscicultura de alevinagem. **Estudos de piscicultura**. Brasília, 1988, 71p.

HEATH, A., CECH JR, J.J., ZINKL, J.G., STEELE, M.D. Sublethal effects of three pesticides on japanese medaka.. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** New York, v. 25, p. 485-491, 1993.

HONTELA, A., DUMONT, P., DUCLOS, D., FORTIN, R. Endocrine na metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metais in the St. Lawrence River. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 14, p. 725-731, 1993.

JUAREZ, L.M.; ROUSE, D.B. Acute toxicity of trichorfon to juvenile freshwater prawn. **Progressive Fish-Culturist**. v.45, n.4, p.214-216, 1983.

KUBITZA, P.F.; KUBITZA, L.M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 3.ed rev., Jundiaí, 1999, 96p.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D.L., COX, M. M. **Principios de Bioquímica**. 2. Ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 725p.

MACHADO NETO, J.G. **Ecotoxicologia de agrotóxicos**. Jaboticabal, FUNEP, 1991. 491p.

MARTINS, L.M. **Doenças infecciosas e parasitárias de peixes**. (Boletim Técnico, 3), Jaboticabal, FUNEP, 1998. 60p.

ONO, E. A.; KUBITZA, Ph. D. F. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. Piracicaba, Brazilian Sport Fish 1997, 96p.

OPUSZYNSKI, K.; SHIREMAN, J.V.; ALDRIDGE, F. Environmental manipulation to stimulate rotifers in fish rearing ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v.42, p.343-348, 1984.

PAVANELLI, G.C., EIRAS, J., TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1998. 288p.

RANZANI-PAIVA, M.J.T., et al. Alterações hematológicas em curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (trichlorfon). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.24, p.187-196, 1997.

RAO, K.S.P.; RAO, K.V.R. Impact of methyl parathion and parathion toxicity and eserine inhibition on acetylcholinesterase activity in tissue of teleost *Tilapia mossambica* – a correlative study. **Toxicol. Lett.** v.22, p. 351-6, 1984.

RODRIGUES, E. de L., et al. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, p.197-203, 1997.

SENHORINI, J.A. et al. Larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, (Pisces, Characidae) em viveiros com e sem organofosforado (folidol 60%). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.4, n.2, p.11-22, 1991.

SILVA, H.C. et al. Sub effects of the organophosphate parathion methyl in *Callichthys callichthys*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.105C, n. 2, p. 197-201, 1993.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.59

SRIVASTAVA, A. k., SINGH, N.N. Effects of acute exposure to methyl parathion on carbohydrate metabolism of Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). **Acta Pharmacologica e Toxicologica**, Copenhagen, v. 48, n. 1, p. 26-31, 1981.

STRAUS, D.L.; CHAMBERS, J.E. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion and S.S.S.-tributyl phosphorotrithioate (DEF). **Aquatic Toxicologg**, New York, v.33, n. 3-4, p. 311-324, 1995.

SUSEELA, K.P.; RAMADEVI, R.; CHANDRAKANTHA, J. Toxic effects of pesticide on survival and proximate composition of *Turbifex turbifex*. **J. Ecotoxicol. Environ. Mont.**, v. 4, n.1, p. 21 – 26, 1994.

TAVARES-DIAS, M., MARTINS, M.L., KRONKA, S.N. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustácea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.16, n. 2, p. 553-555, 1999.

TOMLIN, C. **The pesticide manual – a word compendium**. 10.ed. Local: Crop Protection Publication, 1995. p.1606

TRIPATHI, G.; SHUKLA,S.P. Toxicity of endossulfan and parathion methyl. **Naturalia**, São Paulo, v 17, p.9-15, 1992.

ZAGATTO, P.A.; GOLDSTEIN, E.G. Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. **Ambiente**, São Paulo, v. 5, n.1, p.13-20, 1991.

CAPÍTULO 2

TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA METHYL PARATHION PARA O PACU *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)

Este capítulo foi escrito de acordo com as normas da Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente. CEPPA - Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, o qual será submetido para publicação.

TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA METHYL PARATHION PARA O PACU *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)

Maria Isabel Mataqueiro ¹
Joaquim Gonçalves Machado Neto²

Efetou-se o teste de avaliação da toxicidade aguda do methyl parathion para alevinos de pacu em água mole e água de represa. Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada, segundo normas do IBAMA (1987) e CETESB (1979) para testes de toxicidade aguda para peixes com algumas modificações. Verificou-se mortalidade crescente e linear do pacu com o aumento das doses do inseticida na água. O methyl parathion foi mais tóxico para o pacu em água mole do que em água de represa. Os valores estimados de Cl_{50} de methyl parathion para o pacu em água mole foi de 4,06 mg/L e em água de represa, 5,15 mg/L.

¹Aluna de Pós Graduação do Centro de Aqüicultura - FCAV / Unesp - Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: mbel@fcav.Unesp.br.

² Professor Adjunto do Departamento de Fitossanidade- FCAV / Unesp - Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: joaquim@fcav.Unesp.br

1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por agentes químicos tem ocorrido de acordo com o uso ou acidental e em decorrência da atividade humana. A utilização de agrotóxicos na agricultura e na pecuária tem aumentado consideravelmente e resíduos destes produtos podem ser encontrados em toda a biosfera, contaminando a água, ar, solo e alimentos (CÁCERES et al., 1981).

Na piscicultura, as ectoparasitoses destacam-se como importantes organismos nocivos, pois provocam atraso no crescimento dos peixes e altas taxas de mortalidade (RANZANI-PAIVA et al., 1997). O controle das parasitoses em piscicultura, como na agricultura e pecuária, é feito com agrotóxicos, geralmente aplicados sem orientação adequada e indiscriminadamente (RANZANI-PAIVA et al., 1997 e RODRIGUES et al., 1997).

O uso indiscriminado dos agrotóxicos para controlar as ectoparasitoses em piscicultura tem resultados em poluição ambiental, contaminação dos peixes de cultivo e de todos os organismos envolvidos na cadeia alimentar aquáticas (RANZANI-PAIVA et al., 1997 e RODRIGUES et al., 1997).

FANTA et al. (1997) citam que a preocupação com o controle de riscos à saúde humana e com a manutenção da qualidade dos ambientes naturais levou ao desenvolvimento de uma legislação brasileira para avaliação do risco ambiental dos agrotóxicos. Como em outros países, essa legislação estabelece a realização de vários tipos de testes de avaliação de toxicidade dos agrotóxicos para organismos – teste. Estabelece também, para cada produto, os níveis de concentrações ambientalmente aceitáveis de acordo com os riscos ambientais proporcionados pelas concentrações ambientais estimadas, calculadas com base na recomendação de uso (EPA, 1992).

Os efeitos dos agrotóxicos sobre os organismos aquáticos podem ser estimados e monitorados através de testes de toxicidade conduzidos em condições de laboratório (RAND & PETROCELLI, 1985). Nesses testes, deve-se utilizar, sempre que possível, organismos-teste representativos das regiões sujeitas aos contaminantes. Os testes de toxicidade fundamentam-se na exposição dos organismos - testes em condições de laboratório, cujo ambiente é rigorosamente controlado (temperatura do ar e os parâmetros físico-químicos da água), onde os efeitos tóxicos das substâncias são avaliados (mortalidade e distúrbios morfológicos) e comparados com um tratamento controle (RAND & PETROCELLI, 1985).

A toxicidade aguda (CE_{50}) do inseticida methyl parathion foi estudada para diversas espécies de peixes e de organismos aquáticos. Para peixes, foram calculados os seguintes valores de CE_{50-96h} , em mg de methyl parathion/L de água: 2,75 e 2,70 para truta arco-iris (POST, 1987 e TOMLIN, 1995); 2,26 para *Brachydanio rerio* (WIJK & KRAAIJ, 1994); 5,22 para *Micropterus salmoides* e 8,9 para *Pimephales promelas* (POST, 1987) e de 10,0 para *Heteropneustes fossilis* (JAMES & SAMPATH, 1994). Para peixes da espécie *Walking snakehead* foi calculado o valor de CL_{50-72h} de 4,88 mg de methyl parathion/L (SHEREKAR & KULKARNI, 1989).

A toxicidade aguda do inseticida methyl parathion também foi estudada para outras espécies aquáticas por KUNGOLOS et al. (1999). Estes autores calcularam valores de CL_{50-24h} de 0,009 e CL_{50-48h} de 0,002 mg do methyl parathion/L para o microcrustáceo *Daphnia magna*; CL_{50-48h} de 0,047 para a alga *Selenastrum capricornulum* (CE_{50-48h}) e de 2,0 para a bactéria *Vibrio fischeri*.

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887, é uma espécie onívora, adaptada à ampla variedade de alimentos e aceita muito bem rações balanceadas, o que tem possibilitado a obtenção de excelentes rendimentos desta espécie em piscicultura (CESP, 1998). Portanto, constitui-se uma espécie de grande interesse econômico e deve ser utilizada em estudos ecotoxicológicos (RAND & PETROCELLI, 1985) para avaliação dos efeitos tóxicos dos agrotóxicos utilizados em piscicultura, principalmente do methyl parathion, que é um dos inseticidas organofosforado mais utilizados pelos piscicultores (RANZANI- PAIVA et al., 1997 e RODRIGUES et al., 1997).

Este trabalho foi realizado em condições de laboratório com o objetivo de avaliar a toxicidade aguda (CI_{50-96h}) de methyl parathion para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Condições laboratoriais do teste

Os testes de avaliação da toxicidade aguda de methyl parathion para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Fitossanidade, da FCAV/Unesp – Câmpus de Jaboticabal. Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada com temperatura entre $23 \pm 1^\circ\text{C}$ estabilizadas por meio de um condicionador de ar (Consul Airmaster, 10.000 BTU). O fotoperíodo foi de 11 horas de luz artificial. A metodologia utilizada foi baseada nas normas do IBAMA (1987) e CETESB (1979) para testes de toxicidade aguda para peixes, com algumas modificações.

Organismos-teste

A espécie de peixe utilizada foi o pacu, na fase de alevino, sem distinção de sexo. Indivíduos sadios foram coletados e selecionados da represa do CAUNESP - Centro de Aqüicultura da Unesp, em Jaboticabal, SP, pesando em média 1,5 g.

Inseticida testado

O methyl parathion é um inseticida do grupo químico organofosforado, de amplo uso no combate das pragas da agricultura e vem sendo utilizado pelos piscicultores para o controle de ectoparasitoses de peixes (RANZANI- PAIVA et al., 1997 e RODRIGUES et al., 1997). As características principais do produto comercial utilizado são:

Nome comercial: Folissuper

Concentração do ingrediente ativo: 600g/L

Nome comum: paration metílico (methyl parathion)

Nome químico: Dimetil tiofosfato de p-nitrofenila; 0,0-dimetil-0-p-nitrofenil-fosforotioato; 0,0-dimetil-0-nitrofenil tiofosfato; Dimetil p-nitrofenil tionofosfato; Dimetil p-nitrofenil fosforotioato.

Fórmula bruta: $C_8H_{10}NO_5PS$

Classe de uso: inseticida e acaricida

Classe toxicológica: I – altamente tóxico

Substrato utilizado

Foram utilizados dois substratos; o primeiro foi a água mole reconstituída, preparada de acordo com as normas da CETESB (1979) e da APHA (1991). O segundo substrato utilizado foi a água coletada da represa do CAUNESP - Centro de Aqüicultura da Unesp, em Jaboticabal, utilizada nos testes para representar o meio líquido natural de cultivo de peixes.

Os parâmetros físico-químicos (temperatura, condutividade, pH, oxigênio dissolvido, dureza e alcalinidade) foram medidos diariamente, nas duas águas dos testes, cujas médias estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Parâmetros físico-químicos das águas utilizadas no teste de toxicidade aguda para alevinos de pacu. Jaboticabal – SP.

Parâmetros avaliados	Água mole						Água de represa					
	0	3,2	4,8	6,4	8	9,6	0	3,2	4,8	6,4	8	9,6
Concentrações do methyl parathion (ppm)												
Condutividade (uS/cm)	171	171	170	180	180	175	75	76	76	78	70	70
Alcalinidade (mg/L)	33	33	33	33	35	35	33	32	33	32	30	30
Dureza total (mg CaCO ₃ /L)	52	52	52	52	54	54	40	40	40	40	40	30
Temperatura (° C)	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
pH	7,1	7,2	7,2	7,3	7,3	7,4	8,0	7,9	8,0	7,9	7,9	7,9
Oxigênio dissolvido (mg/L)	8,0	8,0	8,3	8,3	8,4	8,4	8,0	8,5	7,2	7,2	8,6	8,6

A temperatura e o oxigênio dissolvido foram quantificados com um oxímetro da marca Instrutherm, mod. MO-890. A condutividade elétrica foi determinada com condutivímetro da marca Corning, mod. CD 55, o pH com peagâmetro da marca HANNA. A dureza foi calculada pelo método titulométrico com EDTA (APHA, 1991) e a alcalinidade, através de método titulométrico (GOLTERMANN et al, 1978).

Procedimento para realização dos testes

Antes de serem utilizados nos testes, os alevinos selecionados foram aclimatados em caixa de amianto revestidas com tinta epóxi, com capacidade de 1000 L, por um período de sete dias, visando à detecção de parasitas, doenças e recuperação do estresse da captura e transporte. A alimentação durante este período consistiu de ração peletizada triturada, com 23% de proteína bruta, administrada na quantidade de 3% da biomassa do tanque (CASTAGNOLLI, 1992). A alimentação foi interrompida 24 horas antes do início dos testes.

Foram realizados testes preliminares para determinação das faixas de concentração letal do produto. Com base nos intervalos compreendidos entre a maior concentração não letal e a menor concentração letal dos testes preliminares, foram determinadas as seguintes concentrações de 0, 3,2; 4,8; 6,4 e 8,0 ppm do methyl parathion utilizadas nos testes definitivos.

As parcelas experimentais foram frascos de vidro de 10 L de capacidade contendo 5 L de substrato. Cada concentração foi avaliada com 4 repetições, contendo cinco animais cada, resultando em 20 animais por concentração, segundo as normas da APHA (1991). Os animais não receberam alimentação durante as 96 horas de exposição inicial e também não houve troca de água, caracterizando o

sistema do teste como estático. As avaliações de mortalidade dos peixes foram feitas às 24h, 48h, 72h e 96h após o início dos testes, com retirada dos peixes mortos dos frascos de vidro. Os valores de CL_{50-96h} foram calculados com o método estatístico “Trimmed Spearman Karber” (HAMILTON et al., 1977).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos parâmetros físico-químicos das águas utilizadas no teste de toxicidade aguda para alevinos de pacu (Tabela 1) observa-se que as alterações ocorridas foram normais e não interferiram nos resultados obtidos.

As curvas de regressão linear estimadas para a mortalidade do pacu às 96h em água mole e água de represa contendo concentrações crescentes de methyl parathion estão apresentadas na Figura 1. Verifica-se que a porcentagem de mortalidade dos peixes causada pelo methyl parathion aumentou à medida que as doses dos inseticidas também aumentaram. Comparando-se os valores das CL_{50-96h} calculados, verifica-se que o methyl parathion foi 26,8% menos tóxico para os alevinos de pacu em água de represa do que em água mole reconstituída. Esta diferença nos valores de CL_{50} deve-se ao fato de que partes das moléculas do methyl parathion foram imobilizadas pelos componentes da água de represa. Essa imobilização ocorreu principalmente por reação de adsorção da molécula do methyl parathion no material coloidal suspenso da água de represa, como também por retenção/aborção por possíveis organismos vivos presentes além dos peixes.

Os valores de CL_{50-96h} calculados para o methyl parathion em pacu, em ambos os substratos (Figura 1), foram maiores do que os calculados para *Oncorhynchus mykiss*, que foi de 2,75 mg/L (POST, 1987) e 2,70 mg/L (TOMLIN, 1995); 2,26 mg/L para *Brachydanio rerio* (WIJK & KRAAIJ, 1994). Verifica-se que apenas o valor de CL_{50-96h} calculado para a água de represa foi maior que o valor de 4,88 mg de parathion methyl/L calculado para peixes da espécie *Walking snakehead* em teste de 72 horas de exposição (SHEREKAR & KULKARNI, 1989). Por outro lado, os valores CL_{50-96h} ora calculados para o pacu foram inferiores aos 5,22 mg de parathion methyl para *Micropterus salmoides* e 8,9 mg/L para *Pimephales promelas* (POST, 1987) e de 10,0 mg/L para *Heteropneustes fossilis* (JAMES & SAMPATH, 1994).

Com relação a outros organismos aquáticos zoológicamente inferiores aos peixes, verifica-se que o methyl parathion é muito mais tóxico para *Daphnia similis*, em testes de 24 e 48 horas de exposição aguda, para a alga *Selenastrum capricornulum*, em testes de 48 h e para a bactéria *Vibrio fischeri* KUNGOLOS et al. (1999).

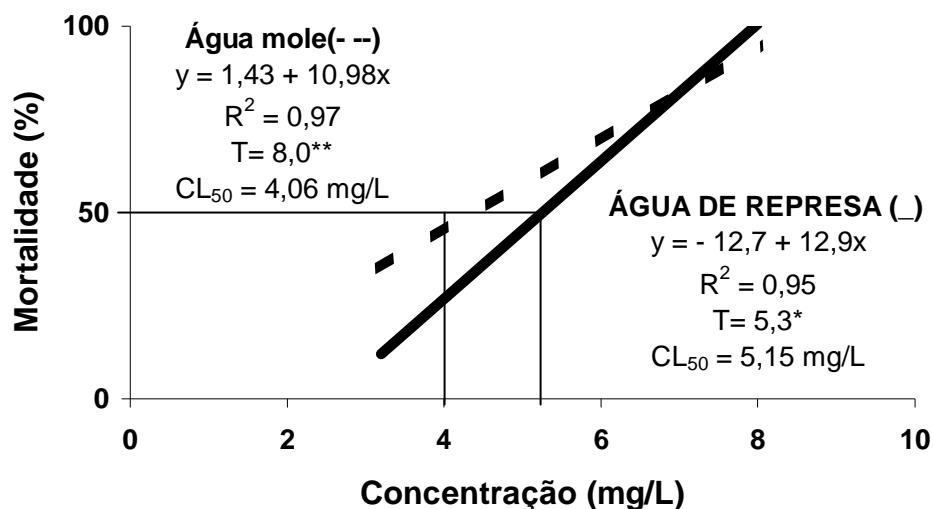


FIGURA 1 - Curva de regressão linear estimada para a mortalidade de pacu exposto a diferentes concentrações do methyl parathion em água mole (- -) e em água de represa (—). ** e * significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade respectivamente. Jaboticabal – SP. 2002.

Estes resultados evidenciam a toxicidade aguda diferencial do methyl parathion para as diferentes espécies de peixes e outros organismos aquáticos (WALTON & BROWN, 1997). Portanto, o uso do inseticida methyl parathion em piscicultura controla os agentes causadores das parasitoses e predadores dos peixes de cultivo mas, ao mesmo tempo, nas dosagens recomendadas pode causar desequilíbrio ambiental devido à mortalidade de organismos benéficos como microcrustáceos, algas e bactérias integrantes das cadeias biológicas aquáticas.

4. CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o meio aquático natural alterou a toxicidade aguda do inseticida methyl parathion para os alevinos de pacu, onde os valores de CL_{50-96h} calculados foram de 4,06 mg/L em água mole e 5,15 mg/L em água de represa.

5. ABSTRACT

The acute toxicity of methyl parathion in pacu fingerlings (*Piaractus mesopotamicus*) subjected to soft and dam water was tested. The experiment was conducted in a controlled system according to IBAMA standards (1987) and CETESB tests (1979) of acute toxicity to fish, with some modifications. We verified a linear increase in pacu mortality with the increase of the insecticide dose in water. Methyl parathion was more toxic to pacu in soft than in dam water. The estimated values of methyl parathion CL_{50} , to pacu in soft and dam water were 4,06 mg/L and 5,15 mg/L, respectively.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 APHA- **Standart Methods for the examination of water and wastewater**. 17. ed. Washington, D.C: American Public Health Association, USA 1991. p.81-143.
- 2 CACERES, O. et al. Resíduos de pesticidas clorados em água das cidades de São Carlos e Araraquara. **Ciênc. Cult.** São Paulo, v.33, n.12, p.162-6, 1981.
- 3 CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.
- 4 CESP. Companhia Energética de São Paulo. Criação de peixes em tanques – rede **Diretoria de Meio Ambiente**. p. 93, 1998.
- 5 CETESB. **Programa de bioensaios**; relatório final anual. São Paulo, 1979. v.1/2, 508p..
- 6 EPA. **Pesticide assessment guidelines**. Subdivision M: microbial pest control agents and biochemical pest control agents. Washington, 1992. 192p.
- 7 FANTA, E.; MOREIRA, A.; SILVA, S.O. Histopatologia do fígado e das brânquias do peixe *Oreochromis niloticus* submetido a diferentes doses de Folidol 600 **Rev. Bras. Toxicol.** v 10, n.2, p. 84 – 142, 1997.
- 8 GOLTERMANN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A.M. **Methods for Physical and Chemical Analysis of Fresh Waters**. 2 ed. Oxford: Blackwell, 1978, 214p.
- 9 HAMILTON, M.A. RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman – Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol**, Washington, v.11, n. 7, p. 714 – 719, 1977.
- 10 IBAMA. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília - SP, 1987, 128p.
- 11 JAMES, R.; SAMPATH, K. Combined toxic effects of carbaryl and methyl parathion on survival growth, and respiratory metabolism in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Acta Hydrobiol.**, Cracow. v.36, n.3, p399-408, 1994.
- 12 KUNGOLOS, A., et al. Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. **Water Sci. Technol** v.40, n.1, p. 357-364, 1999.
- 13 POST, G. **Texbook of Fish Health**. TFH Publications. 1987, 288p.
- 14 RAND, G.M. PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington: G.M. Rand &; S.R. Petrocelli eds. 1985, 665p.
- 15 RANZANI-PAIVA, M.J.T. et al. Alterações hematológicas em curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Trichlorfon). **B. Inst. Pesca**, v.24, p.187-196, 1997.

- 16 RODRIGUES, E. de L. et al. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 24, p.197-203, 1997.
- 17 SHEREHAR , P.Y.; KULKARNI, K.M. Protein changes in the fish *Channa orientalis* exposed to methyl parathion. **J. Ecobiol.** India, v.1, n.2, p.103-108, 1989.
- 18 TOMLIN, C. **The pesticide manual – a word compendium**. 10.ed. Local: Crop Protection Publication, p. 1606, 1995.
- 19 WALTON,W.J.; BROWN, M.J.LYDY. Diurnal Fluctuations in Toxicity in Two Fish Species: *Gambusia affins* and *Notropis ludibundis* **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** New York, v.59, p.414-421, 1997.
- 20 WIJK, R.J.; KRAAIJ, R. Use of model parameter estimations from standart fish toxicity tests to Indicate toxic mechanisms. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** New York, v.53, p. 171-178, 1994.

Capítulo 3

EFEITOS DO METHYL PARATHION EM PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DO PACU *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (OSTEICHTHYES: CHARACIDAE)

Este capítulo foi escrito de acordo com as normas da revista Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. (Springer – Verlag New York Inc.USA) à qual será submetido para publicação.

**EFEITOS DO METHYL PARATHION EM PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DO
PACU *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (OSTEICHTHYES: CHARACIDAE)**

MI Mataqueiro,¹ e JG Machado-Neto²

¹Aluna do Programa de Pós Graduação em Aqüicultura de Águas Continentais do Centro de Aqüicultura - FCAV / Unesp, Câmpus de Jaboticabal. e-mail: mbel@fcav.Unesp.br

²Professor Adjunto do Departamento de Fitossanidade- FCAV / Unesp, Câmpus de Jaboticabal. e-mail: Joaquim@fcav.Unesp.br

Correspondência para: MI Mataqueiro

Os inseticidas organofosforados são utilizados em piscicultura para controlar parasitos dos peixes (Kime 1998) e insetos predadores aquáticos (Figueiredo e Senhorini 1990), porém causam poluição das águas, desequilíbrio ambiental e intoxicação de peixes (Kime 1998) e outros organismos aquáticos (Kungolos et al 1999). O methyl parathion é um inseticida organofosforado muito utilizado na área agrícola e pode ser carregado com a água de enxurrada e contaminar a rede hidrográfica local, além da aplicação diretamente nas águas das pisciculturas. No ambiente aquático, o methyl parathion pode causar intoxicações nos organismos não-alvos de controle como os peixes (Straus e Chambers 1995).

Os inseticidas organofosforados inibem a enzima acetilcolinesterase (AchE), presente nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso, impedindo a hidrólise da acetilcolina (Bastos et al. 1998; Aguiar et al. 2000). Portanto, espera-se que a presença destes inseticidas nas águas pode causar efeitos subagudos nos peixes, alterando a fisiologia e a homeostase orgânica dos animais (Iwama 1993). Os efeitos subagudos são respostas fisiológicas à ação tóxica indireta dos inseticidas organofosforados, que resulta da ativação do sistema neuro-endócrino, composto pelo sistema nervoso simpático-tecido cromafim e o eixo hipotálamo-pituitária-interrenal. A ativação do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) resulta na elevação da concentração do cortisol no sangue, sintetizado nas células interrenais dos peixes, situadas na porção cefálica do rim (Barton e Iwama 1991; Krieger-Azzolini et al. 1989). Esta ativação também pode causar aumentos no volume de eritrócitos, da quantidade de hemoglobina, do hematócrito, dos leucócitos e de outros elementos sanguíneos (Sopinska 1984; Dick e Dixon 1985, Pickering e Pottinger 1987).

Os efeitos dos inseticidas organofosforados no quadro sanguíneo de peixes após a exposição têm sido relatados por diversos autores. O inseticida methyl parathion causou aumento nos valores de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos (Heath et al 1993; Nath e Banerjee 1996; Fanta et al. 1997; Aguiar et al 2000). Por outro lado, o inseticida trichlorfon causou decréscimos significativos nas quantidades de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina dos peixes (Rodrigues et al. 1997, Ranzani-Paiva et al. 1997, Tavares Dias et al. 2000). Em relação aos parâmetros

biométricos, Kurovskaya e Osadchaya (1993) relatam aumento na relação esplenossomática nos peixes depende da intensidade da infecção parasitária. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos subagudos do inseticida methyl parathion em peixes da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 256 espécimes de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, com peso corpóreo médio entre 200 a 300 g, oriundos do Centro de Aqüicultura da Unesp. Foi realizado um exame histopatológico de fragmentos de brânquias de exemplares deste mesmo lote de pacu onde foi verificado a presença dos parasitas *Henneguya* sp e *Ichthyophthirius multifiliis*. Os peixes foram distribuídos e aclimatados por sete dias em 16 caixas de cimento amianto de 500 L, com fluxo de água contínuo, no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) - Unesp – Câmpus de Jaboticabal, alimentados duas vezes ao dia com dieta comercial extrusada. O período experimental foi de 15 dias e iniciou-se com a aplicação de methyl parathion nas concentrações 0,0, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/L em quatro caixas (repetições) por concentração. O methyl parathion foi adicionado às caixas com o fluxo de água interrompido por 24 horas após as aplicações, período em que a oxigenação foi mantida com aeradores. Após as 24 horas iniciais de exposição o fluxo de água foi restabelecidos em todas as caixas na vazão de 400 mL/min. O período de 24 horas de exposição foi utilizado considerando-se que a meia vida do methyl parathion na água foi estimada entre 11,1 e 13,4 horas (Ferrando et al. 1992).

Os efeitos subagudos do methyl parathion nos peixes foram avaliados aos 3, 8 e 15 dias de exposição, devido ao fato de os inseticidas organofosforados serem excretados ou metabolizados no organismo dos peixes nesse período (Silva et al. 1993). Nos dias das coletas, os peixes estavam em jejum por 24 horas. Em cada dia de coleta, três peixes por repetições foram sacrificados para retirada do material biológico. Os peixes foram capturados e imediatamente anestesiados com benzocaína adicionada na água na concentração de 1 g/15 L (Carneiro e Urbinati 2001).

O sangue foi retirado por punção caudal com seringas lavadas em solução de EDTA (10%). Foram realizadas as seguintes avaliações nas amostras de sangue: contagem de eritrócitos, utilizando-se o aparelho diluidor D.A 500 marca CELM e contador D.C. 510, marca CELM; hematócrito, realizado pelo método do microhematócrito (Goldenfarb et al. 1971) e taxa de hemoglobina, utilizando-se o Kit Labtest e a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer. Com esses dados, foram calculados o volume corpuscular médio ($VCM = \text{hematócrito} \times 10 / n^{\circ}$ de eritrócitos) e a concentração de hemoglobina corpuscular média ($CHCM = \text{taxa de hemoglobina} \times 100 / \text{hematócrito}$), segundo o método de Wintrobe (1934). Em extensões sangüíneas das amostras de sangue foram realizadas a contagem diferencial de leucócitos e a contagem de trombócitos totais (Rosenfeld, 1947). A identificação dos leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células imaturas e células granulocíticas especiais), foi realizada com base no trabalho de Tavares-Dias (1999b). Para a contagem de trombócitos ($n^{\circ}/\mu\text{L}$), multiplicou-se o número de trombócitos quantificados na extensão sangüínea pelo

número de eritrócitos/3000 eritrócitos contados segundo Tavares-Dias et al. (1999a).

A dosagem do cortisol plasmático foi realizada pelo método de radioimunoensaio, utilizando-se o Kit DPC (Diagnostic Products Corporation). Após a colheita do sangue, os peixes foram pesados e imediatamente abertos ventralmente para retirada do fígado e do baço. Foram calculadas a relação hepatossomática (RHS% = peso do fígado/peso total x 100) e a relação esplenossomática (RES% = peso do baço/peso total x 100).

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas, como parcelas os tratamentos (concentrações de 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg de methyl parathion/L) e subparcelas as datas de coletas dos peixes: 3, 8 e 15 dias após a exposição (Pimentel-Gomes, 1982).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 observa-se que o inseticida methyl parathion não afetou os parâmetros hematológicos, hormonal, bioquímicos e biométricos avaliados nos peixes quando expostos às concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 ppm. Entretanto, ao longo do período experimental ocorreram apenas alterações significativas nos parâmetros: hemoglobina, cortisol, célula granulocítica especial (CGE), eritrócitos e volume corpuscular médio (VCM). Efeitos significativos na interação (concentração x data de coleta) ocorreram apenas para contagem dos eritrócitos dos peixes. Os desdobramentos destes efeitos significativos estão apresentados na Tabela 3.

Na Tabela 2 verifica-se aumento significativo das médias das taxas de hemoglobina, cortisol e eritrócitos e redução significativa das médias dos parâmetros CGE e VCM, durante o período do experimento. O aumento significativo do nível de cortisol no sangue do pacu em função das datas de coletas pode ser explicado pelo estresse à exposição ao methyl parathion, inibindo determinadas quantidades da enzima acetilcolinesterase. Pois Pickering et al. (1987) citam que a redução da atividade desta enzima pode causar altas concentrações plasmáticas de cortisol por longo período. A duração e a magnitude do aumento da concentração do cortisol no sangue depende da severidade e duração da exposição ao estressor a que os peixes foram submetidos (Barton 1980, Sumpter 1997, Pickering e Pottinger 1982, Vijayan e Moon 1994 e Wendelaar Bonga 1997).

Os aumentos significativos nas contagens dos eritrócitos e hemoglobina e a diminuição do volume corpuscular médio (VCM) no sangue do pacu (Tabela 2) estão diretamente relacionado com a ação dos glicocorticoides, produzido pelo aumento das concentrações de cortisol no sangue dos peixes. O aumento do cortisol circulante é responsável por diversas modificações fisiometabólicas observadas em situações de estresse, elevando o número de eritrócitos e hemoglobina e, conseqüentemente, a redução do valor do VCM (hematócrito x 10/ n° de eritrócitos) (Hayne,1990). Aguiar et al. (2000) estudaram os efeitos das concentrações de methyl parathion (0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 7,0 mg/L) sobre matrinxã (*Brycon cephalus*), com 4 horas de reposição. Verificaram que os parâmetros hematológicos foram relacionados à resposta de estresse, com elevações dos

valores de hematócrito e hemoglobina nas menores concentrações (0,5 e 1,0). Segundo Ranzani-Paiva et al. (1987) em carpa, (*Cyprinus carpio*), infestada por *Argulus* sp. e tratadas com neguvon, (organofosforado), ocorreu aumento na contagem de eritrócitos e hemoglobina e diminuição no VCM, concordando com o efeito ora observado no pacu (Tabela 2). Estes resultados diferem dos obtidos por Tavares-Dias et al (1999a) quando estudaram os efeitos do inseticida trichlorfon no pacu exposto à concentração 0,4 mg de trichlorfon /L, que causou redução no número de número reduzido de eritrócitos ($2,50.10^6/\mu\text{L}$ foi a média encontrada dos peixes controle e $1,90.10^6/\mu\text{L}$, a média para os animais tratados) e hemoglobina.

Tabela 1- Valores de F calculados nas análises estatísticas dos parâmetros hematológicos, hormonal, bioquímicos e bioquímicos avaliados em pacus expostos a concentrações crescentes de methyl parathion. Jaboticabal – SP. 2002.

Parâmetros	Valores de F		
	Concentração (C)	Data de coleta (DC)	Interação (Cx DC)
Hemoglobina	0,04 ns	6,83 **	0,43 ns
Hematócrito	0,29 ns	1,86 ns	0,76 ns
Cortisol	0,30 ns	34,29 **	0,39 ns
Trombócitos	1,45 ns	0,59 ns	1,43 ns
Linfócitos	0,45 ns	0,71 ns	1,64 ns
Neutrófilos	2,41 ns	0,17 ns	0,27 ns
Monócitos	2,16 ns	0,01 ns	0,95 ns
CGE	0,36 ns	5,78 **	0,60 ns
C. Imaturas	1,72 ns	2,03 ns	0,43 ns
Eosinófilos	2,27 ns	1,25 ns	1,87 ns
Eritrócitos	1,32 ns	9,20**	4,88**
RES	2,55 ns	1,70 ns	1,02 ns
RHS	0,75 ns	2,15 ns	1,89 ns
Leuc. Totais	1,75 ns	0,89 ns	0,60 ns
VCM	0,17 ns	7,16 **	1,87 ns
CHCM	0,58 ns	1,01 ns	0,22 ns

ns= não significativo * P< 0,05 ** P< 0,01

C.G.E.= Célula granulocítica especial RHS = relação hepatossomática

VCM = Volume Corpuscular Médio RES = relação esplenossomática

CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média

Na Tabela 2 verifica-se redução significativa no percentual de células granulocíticas especiais (CGE) a partir do oitavo dia de exposição, demonstrando o efeito do controle dos parasitas *Henneguya* sp e *Ichthyophthirius multifiliis* nos peixes, proporcionado pelo inseticida. Entretanto o controle dos parasitas não foi avaliado neste trabalho. Célula granulocítica especial é um tipo de leucócito que normalmente ocorre em baixa frequência relativa nessa espécie quando comparado aos demais tipos de leucócitos. Este granulócito aparece como uma resposta característica e imediata em peixes infectados por parasitas (Ranzani-Paiva 1991).

Tabela 2. Valores médios de hemoglobina, cortisol, CGE, eritrócitos e VCM do pacu após exposição ao methyl parathion. Jaboticabal – SP. 2002.

Parâmetros	Dias após a exposição			
	3	8	15	DMS (5%)
Hemoglobina (g/dL)	8,89 b	9,40 ab	9,89 a	0,67
Cortisol (ng/mL)	30,68 b	45,23 b	97,95 a	21,33
CGE (n°/µL)	1.385,00 a	255,00 b	175,00 b	14,93
Eritrócito (10 ⁶ /µL)	2,43 b	2,72 a	2,83 a	0,47
VCM (g/dL)	139,60 a	125,4 0 b	121,6 b	1,38

C.G.E.= Célula granulocítica especial VCM = Volume Corpuscular Médio
Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05).

Na Tabela 3 verifica-se que nos dias de coleta houve aumento significativo do número de eritrócitos, que pode ter sido causado pelo aumento da concentração do cortisol no sangue. O aumento do cortisol, provocado pela exposição ao organofosforado que, ao inibir a enzima acetilcolinesterase dos peixes, constitui-se em uma resposta metabólica do peixe, tais como os aumentos da maior concentração do número de eritrócitos e de hemoglobina. Estes aumentos provocados pelo cortisol e as catecolaminas nos peixes causam dilatação branquial estimulando a captação de oxigênio. O suprimento de oxigênio para os tecidos corporais é promovido pelo efeito direto no volume dos eritrócitos e no pH intracelular (Weenderlar Bonga 1997). A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é também aumentada pelas catecolaminas (Sumpter 1997).

O aumento significativo do número de eritrócitos (Tabela 3) do tratamento controle está relacionado com a presença dos parasitas *Henneguya* sp e *Ichthyophthirius multifiliis* nos peixes. Este fato verifica-se claramente no tratamento testemunha e na concentração 0,5 ppm, onde ocorreram aumentos significativos do número de eritrócitos. Nos tratamentos nas concentrações de 1,0 e 2,0 ppm, os parasitos foram bem controlados e os peixes deixaram de responder à presença dos parasitos com o aumento no número de eritrócitos. Estes dados evidenciam que neste tratamento de 0,5 ppm o controle dos parasitas foi menor que nas concentrações de 1,0 e 2,0 ppm. Por outro lado, Aguiar et al. (2000) citam que a diminuição dos eritrócitos dos peixes 15 dias após a exposição na concentração de 2 ppm, pode estar relacionada a lesão causada no tecido hematopoiético. Estes autores citam também que nas concentrações 0,5 e 1,0 ppm ocorreu diminuição do número de eritrócitos que podem estar relacionada à uma provável lesão na estrutura branquial do peixe. Entretanto, nos resultados da Tabela 3 verifica-se que o aumento no número de eritrócitos no sangue dos peixes nos dias de coleta após as exposições às concentrações crescentes de methyl parathion na água está relacionado à infestação dos parasitas e não a efeitos tóxicos do inseticida, discordando das possíveis explicações propostas por Aguiar et al. (2000).

Tabela 3. Valores médios de eritrócitos nos dias após a exposição x concentrações. Jaboticabal –SP. 2002.

Concentração	Dia após a exposição		
	3	8	15
0,0	2,31 c	2,80 b	3,39 a A
0,5	2,21 b	2,80 a	2,73 a B
1,0	2,66	2,65	2,81 AB
2,0	2,55	2,62	2,37 B
Média	2,43	2,71	2,83

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, e minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as concentrações e dias de exposição, respectivamente.

Verifica-se nestes resultados que o pacu foi tolerante à exposição ao methyl parathion nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 ppm, uma vez que ocorreram apenas alterações hematológicas causadas pelas infestações dos parasitas *Henneguya* sp e *Ichthyophthirius multifiliis* e não a efeitos tóxicos do inseticida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar LH, Correa CF, Moraes C (2000) Efeitos do pesticida organofosforado methyl parathion (folidol 600) sobre o metabolismo e atividade de colinesterase do teleósteo de água doce, *Brycon cephalus* (matrinxã). In: Espíndola ELG, Botta-Paschoal CMR, Rocha O, Boher MBC, Oliveira-Neto AL(ed) Ecotoxicologia: perspectivas para o Século XXI, RiMa, São Carlos, p.575
- Barton BA, Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Ann Rev Fish Disease 3-26
- Bastos VLFC, Folly E, Rossini A, Ceccarelli PS, Senhorini JA, Bastos JC (1998) Paraoxonase activity in liver of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Characidae), Revta Bras Zool 15(5):677-685
- Carneiro PC, Urbinati, EC (2001) Plasma eletrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus*, (Teleos: Characidae) transported under influence of benzocaine, Journal of Applied Aquaculture 11(4) 321-26
- Dick PT, Dixon DG (1985) Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. J Fish Biol 26(4): 475-48
- Fanta E, Moreira A, Silva, SO (1997) Histopatologia do fígado e das brânquias do peixe *Oreochromis niloticus* submetido a diferentes doses de Folidol 600 Revista Brasileira de Toxicologia. 10(2): 84 – 142
- Ferrando MD, Alacórn V, Fernández-Casalderrey A, Garmón M, Andreu-Moliner E (1992) Persistence of some pesticides in the aquatic environment 48:747-755

- Figueiredo GM, Senhorini JA (1990) Influência de Biocidas no desenvolvimento da carpa comum (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1958) e sobre o zooplâncton, durante o período de larvicultura. Boletim Técnico do CEPTA P. Pirassununga 3:5-21
- Goldenfarb PB, Bowyer FP, Hall E, Brosious E (1971) Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. American Journal of Clinical Pathology 56:35-39
- Heath A, Cech JJ, Zinkl JG, Steele MD (1993) Sublethal effects of three pesticides on Japanese medaka. Arch Environ Cont Toxicol 25:485-491
- Iwama GK (1993) Intensive fish production. Course manual UBC Access Guided Independent Study. The University of British Columbia. Vancouver, BC Canada
- Kime DE (1998) Endocrine Disruption in Fish. Kluwer Academic Publishers, London, p.396
- King EJ, Garner RJ (1947) Colorimetric determination of glucose J Clin Pathol 1:30-33
- Krieger-Azzolini MH, Delattre E, Carsfeld J, Cecarelli P, Menezes PV (1989) A time-course study of physiological indicators of handling stress in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu) Braz J Med Biol Res 22:1019-1022
- Kungolos A, Samaras P, Kipopoulou AM, Zomboulis A, Sakellariopoulos AM (1999) Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. Wat Sci Tech 40(1):357-364
- Kurosvskaya, W.S. & Osadchaya, S.A. (1993) The influence of *Ichthyophthirius multifiliis* on underyearling carp, *Cyprinus carpio* Journal Ichthyol.33(4):81-92
- Martins ML, Onaka EM, Moraes FR, Fujimoto R (2001) Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. Acta Parasitologica 46(4):332-336
- Nath R, Banerjee V (1996) Effect of pesticides methyl parathion and cypermethrin on the air-breathing. Environ-Ecol 14(1):163-165
- Pickering AD (1984) Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. General and Comparative Endocrinology 53:252-259
- Pickering AD, Pottinger TG (1987) Lymphocytopenia and interrenal activity during sexual maturation in the brown trout *Salmo trutta* L. J Fish Biol 30:41-50
- Pickering AD, Pottinger TG, Christie P (1982) Recovery of the trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: A time-course study. J Fish Biol 24: 731-740
- Ranzani-Paiva MJ (1991) Hematologia de peixes In: Santos HS (Ed). Histologia dos peixes São Paulo, FCAV-Unesp 83p
- Pimentel-Gomes, F. (2000) Curso de Estatística Experimental. Degaspari, São Paulo, 477p.
- Ranzani-Paiva MJ, Ishikawa CM, Portella MC, Celiberto RJ (1987) Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após um tratamento com fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2,-triclóroetilo (Neguvon). Bol Inst Pesca,14: 83-92, 1987.

- Ranzani-Paiva MJ, Vieira AL, Ishikawa CM (1989) Análise dos constituintes do plasma sanguíneo da carpa, *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. Bol. Inst. Pesca,16(1): 117-121
- Ranzani-Paiva MT, Rodrigues EL, Eiras AC, Veiga ML, Pacheco FJ (1997) Alterações Hematológicas em Curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Trichlorfon). Bol. Inst. Pesca 24:187-196
- Robert, C.; Haynes, Jr.(1990) Adrenocorticotropic Hormone; Adrenocortical steroids their and synthetic analogs; Actions of Adrenocortical hormones. In: Gilman A G.; Rall T.W.; Nies A. S.; Taylor P. (eds.) The pharmacological basis of therapeutics, Pergamon Press, São Paulo, p. 1431-1442
- Robertson L, Thomas P, Arnold, CR, Trant JM (1987) Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density and a disease outbreak. Prog Fish-Cult 49(1):1-12
- Rodrigues EL, Ranzani - Paiva M J, Pacheco FJ, Veiga ML, Eiras A C (1997) Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). CEPTA. 24:197-203
- Rosenfeld G (1947) Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido Mem Inst Butantan 20:329-334
- Seifert J (2001) Toxicologic significance of the hyperghycemia caused by organophosphorous insecticides Bull Environ Contam Toxicol 67:463-469
- Silva HC, Guilherme-Medina H, Fanta E, Bacila M (1993) Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys* (Pisces: Teleostei) 105(2):197-201
- Sopinska A (1984) Effects phisyological factores, stress and disease on hematological parameters of carp, with a particular reference to the leucocyte patterns..Hematological results of stress in carp. Acta Ichthyol. Pisc 14(1/2):125-139
- Srivastava AK, Singh NN (1981) Effects of acute exposure to methyl parathion on carbohydrate metabolism of Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*) Acta Pharmacol Toxicol 48(1):26-31
- Straus DL, Chambers JE (1995) Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterase of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion and SSS-tributy phosphorotrithioate (DEP) Aquat Toxicol 33(3-4):311-324
- Sumpter JF (1997) The endocrinology of stress In: Iwama GK, Pichering AD, Sumpter JP, Schreck CB. Fish stress and health in aquaculture. Cambridge University Press p.95-117
- Tavares-Dias M, Martins ML, Moraes FR (2000) Relação hepatossomática e esplenossomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. Revta brás. Zool. 17(1):273-281
- Tavares-Dias M, Martins ML, Kronka SN(1999a) Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustácea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. Rev Bras Zool 16(2): 553-555.
- Tavares-Dias, M., Sandrim, E.F.S. and Campos-Filho, E. (1999b). Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes:

- Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. Revta. Bras. Zool., 16: 175-84.
- Vijayan MM, Reddy PK, Leatherland JF, Moon TW (1994) The effects on Hepatocyte metabolism in Rainbow Trout: a study using the steroid apalogue RU486. Gen Comp Endocrinol 96:75-84
- Wedemeyer G (1970) Stress of anaesthesia with MS222 e benzocaina in rainbw trout (*Salmo g.*) J Fish Res Board Can 27:909-914
- Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. Physiol. Rev 77:591-625
- Wintrobe MM (1934) Varations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. Folia Haemat 51:32-49

RESUMO

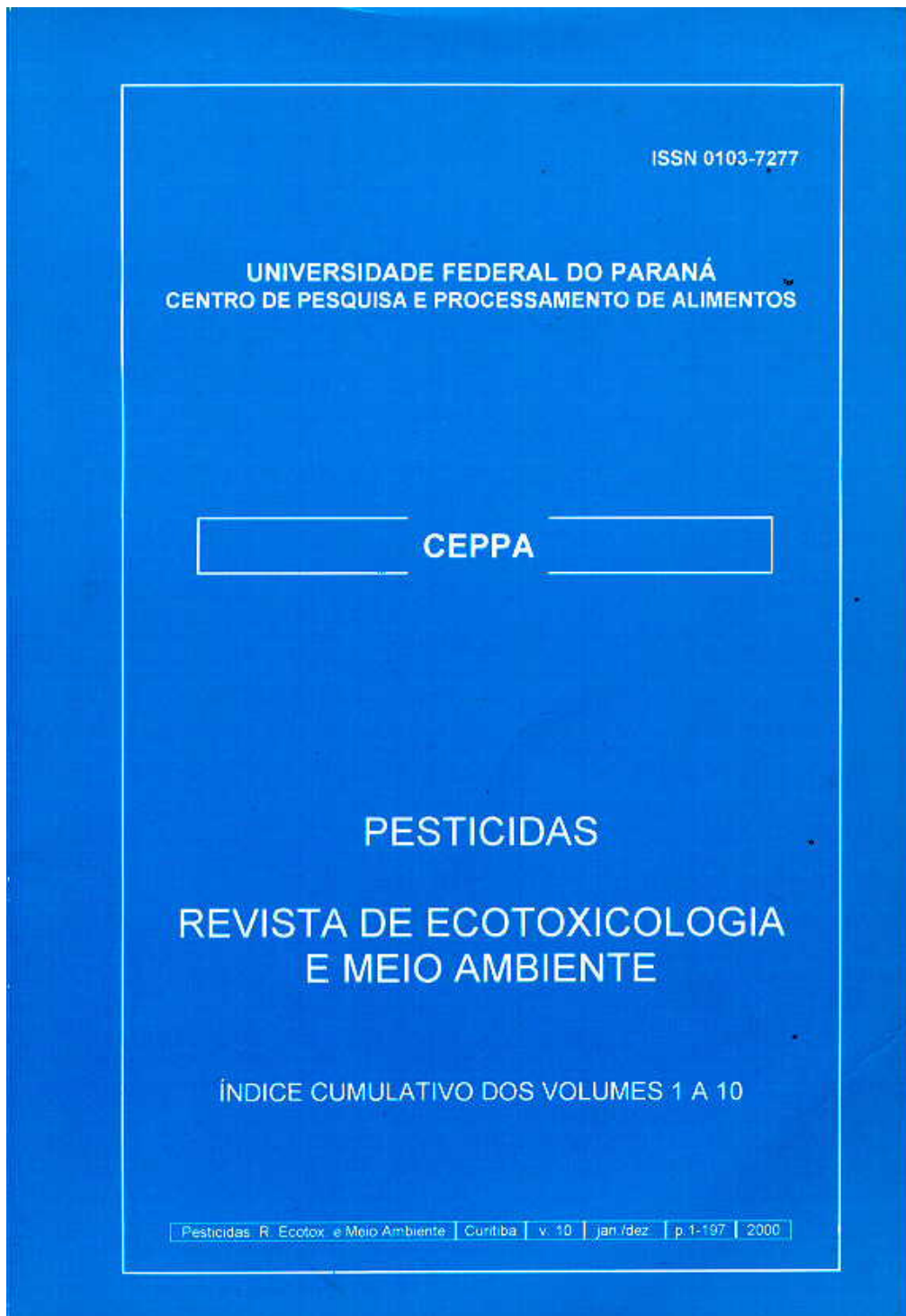
Os objetivos desse trabalho foram avaliar a toxicidade aguda e os efeitos subagudos hematológicos, hormonal, bioquímicos e biométricos do inseticida methyl parathion em pacu. Os testes de avaliação da toxicidade aguda de methyl parathion foram realizados com alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* expostos em dois substratos: água mole e água de uma represa de cultivo de peixes do CAUNESP, em Jaboticabal. Os efeitos subagudos foram avaliados em peixes com peso corpóreo entre 200 a 300 g. O methyl parathion foi aplicado nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L de água de abastecimento em quatro caixas de 500 L de água por concentração em exposição de 24 horas com interrupção do fluxo de ar de 400 ml/min.. Foi realizado um exame histopatológico de fragmentos de brânquias de exemplares deste mesmo lote de pacu onde foi verificado a presença dos parasitas *Henneguya* sp e *Ichthyophthirius mutifilis*. Aos 3, 8 e 15 dias após a exposição ao inseticida foram coletados sangue dos peixes e realizou-se a contagem dos números de eritrócitos, leucócitos, trombócitos, hemoglobina, hematócrito, e quantificação de cortisol, índices hepatossomáticos e volumes corpusculares. O methyl parathion foi mais tóxico para o pacu em água mole do que em água de represa, cujos valores de CL_{50-96h} calculados foram de 4,06 mg/L em água mole e 5,15 mg/L em água de represa. Não houve efeitos significativos das concentrações do inseticida nos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados nos peixes. Ocorreu aumento significativo do nível de cortisol, devido ao efeito estressor do methyl parathion, inibindo determinadas quantidades da enzima acetilcolinesterase. Os aumentos significativos nas contagens dos eritrócitos e hemoglobina e a diminuição do VCM no sangue do pacu estão diretamente relacionado com a ação dos glicocorticoides produzidos pela elevação das concentrações do cortisol no sangue. A redução percentual significativade CGE a partir do oitavo dia de exposição demonstra o efeito do controle dos parasitas *Henneguya* sp e *Ichthyophthirius mutifilis* nos peixes, proporcionado pelo inseticida. A na interação significativa entre a concentração e o dia de coleta para a contagem no parâmetro número de eritrócitos no sangue dos peixes após exposições crescentes de methyl parathion na água está relacionado à infestação dos parasitas e não a efeitos tóxicos do inseticida. O pacu foi tolerante à exposição ao methyl parathion nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 ppm, uma vez que ocorreram

apenas alterações hematológicas causada pelas infestações dos parasitas *Henneguya* sp e *Ichthyophthirius multifiliis* e não a efeitos tóxicos do inseticida.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the acute toxicity and subacute effects on hematological, hormonal, biometrical and biochemical parameters of the methyl parathion insecticide on pacu. The acute toxicity evaluation tests were performed on fingerling pacu, (*Piaractus mesopotamicus*) exposed to two substrates: soft water and water collected from a CAUNESP's dam, in Jaboticabal. The subacute effects were evaluated in pacu with a body weight range between 200 and 300 g. The methyl parathion was added to four 500 water tanks to yield concentrations of 0.0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg/L, to which the fishes were for a period of 24 hours with air movement interruption of 400ml/min. The histopathologic examination of branchias specimens from these subjects revealed the presence of the parasites *Henneguya* sp and *Ichthyophthirius multifiliis*. After 3, 8 and 15 days of exposition to the insecticide, blood samples were collected from the fishes to determine the levels of erythrocytes, leukocytes, trombocytes, hemoglobin, cortisol, packed cell volume and hepatossomatics index and corpuscular volumes. The methyl parathion toxicity was more intense in the soft water than in the dam water, considering that the CL_{50-96h} values were 4,06 mg/L in the soft water and 5,15 mg/L in the dam water. There was a significative increasing of the cortisol level, due to the methyl parathion stressing effects by the inhibition of acetylcholinesterase activity. The significative increasing on erythrocytes and hemoglobin levels and the reduction of MCV in the pacu blood were directly related to the glucocorticoids activity that were produced due the concentration elevations of cortisol in the blood. The significative percentage reduction is related to the control of *Henneguya* sp and *Ichthyophthirius multifiliis* in parasitism in the fishes by the insecticide. The significative interaction between the concentration and the exposition period in relation to the erythrocytes levels, after exposition to increasing concentrations to methyl parathion, was due to the parasitism and not to the toxic effects of the insecticide. The pacu supported the exposition to methyl parathion at doses of 0.5, 1.0 and 2.0 ppm, considering that there were only hematological alterations due to the presence of *Henneguya* sp and

Ichthyophthirius multifiliis parasites, and not related to the toxic effects of the insecticide.

ANEXOS**ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA CEPPA**

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A Revista divulga trabalhos técnico-científicos inéditos, resultantes de pesquisa e revisões bibliográficas na área de agrotóxicos e seus resíduos, ecotoxicologia e meio ambiente.

As opiniões emitidas nos artigos são de exclusiva responsabilidade dos autores. A Revista se reserva o direito de adaptar os originais para manter a homogeneidade da publicação, respeitando sempre, o estilo do autor.

Os trabalhos devem ser apresentados de acordo com as disposições normativas abaixo:

Forma do manuscrito

As colaborações devem ser entregues em duas vias, digitadas em **Word for windows 6.0**, usando fonte **Arial**, tamanho **12**, espaçamento simples e organizadas da seguinte forma:

- Título breve e descritivo do conteúdo do artigo;
- nome do autor (endereço e instituição a que pertence em nota de rodapé);
- resumo em português (não mais que 250 palavras ou 5% do texto);
- introdução;
- material e métodos;
- resultados e discussão;
- conclusão;
- abstract (resumo em inglês);
- referências.

Tabelas e ilustrações

As tabelas e ilustrações devem ser numeradas distinta e consecutivamente, inseridas o mais próximo possível do local em que são mencionadas no texto e apresentar títulos explicativos digitados **acima** da ilustração.

Para assegurar nitidez após a redução para o tamanho 12 x 18 cm, os **desenhos, mapas e fotografias** devem ser apresentados no original em **preto e branco**.

Conjugação verbal

Recomenda-se a expressão impessoal, evitando o uso da primeira pessoa do singular ou plural. Os dados referentes aos resultados de experiências e observações devem ser expressos no passado. Generalidades, verdades imutáveis, fatos e situações estáveis exigem formas verbais indicativas de seu valor constante (presente).

Referências

As referências efetivamente citadas no artigo devem constituir lista única no final do trabalho e serem apresentadas de acordo com a NBR - 6023/00 (reeditada em agosto de 2000) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Os artigos também poderão ser entregues via e-mail (ceppa@bsi.com.br).

As referências devem ser indicadas no texto pelo sistema autor/data ou com algarismos arábicos entre parênteses, no final da citação, segundo a ordem em que aparecem na lista de referências bibliográficas (alfabeticamente ou por ordem de citação).

Consideram-se elementos essenciais em referências de monografias: autor(es); título da obra; edição; local; editora; data de publicação; número total de páginas ou página inicial e final da parte consultada.

Ex.: CAMARGO, P.N. **Herbicidas orgânicos: fundamentos químico-estruturais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1986. 275 p. 157 p.

Para publicações periódicas os elementos essenciais são: autor(es); título do artigo; título do periódico; local; número do volume e fascículo; página inicial e final do artigo e data (mês/ano).

Ex.: BASSFELD, J. C., SHOOK, D.D. Ecotoxicology: basic approaches. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 7, p. 1-17, jan./dez. 1997.

Para referenciar documentos eletrônicos deve-se prestar atenção quanto ao emprego correto de letras maiúsculas e minúsculas, bem como aos sinais de pontuação e espaçamento entre os dados do endereço.

- *Artigos de jornal*: autor(es); título do artigo; título do jornal; [tipo de suporte], local (se disponível ou identificável), dia mês (abreviado) ano. Disponível em: protocolo (se aplicável): <sítio/caminho/arquivo> [Data de acesso do arquivo].

Ex.: SANTOS, Sady. Por que os funcionários públicos? **Gazeta do Povo** [online], Curitiba, 11 dez. 1997. Disponível: <<http://www.dopovo.com/universo/colunistas/hoje/opinio3.html>> [Acesso em 11 dez. 1997].

- *Artigos de revista*: autor(es); título do artigo; título da revista; [suporte], local, volume, número, paginação, mês (abreviado) ano. Disponível em: protocolo (se aplicável) <sítio/caminho/arquivo> [Data de acesso do arquivo].

Ex.: TABELA de vírus. **Conecta** [online], São Paulo, dez. 1997. Disponível em: <<http://www.manchete.com.br/conecta/index.htm>> [Acesso em 17 dez. 1997].

- *Trabalho individual*: autor(es); título; [suporte]. Disponível: protocolo (se aplicável): sítio/caminho/arquivo [Data de acesso do arquivo].

Ex.: MOURA, Gevilacio A. C. **Citação e referências a documentos eletrônicos** [online]. Disponível em: <<http://www.elogica.com.br/users/gmoura/refere.html>> [Acesso em 9 out. 1996].

- *E-mail (mensagem pessoal)*: autor(es) (endereço*); título; destino (endereço) [Data de acesso do arquivo].

Ex.: PEROTA, M.L.L.R. (cperota@megabox.com.br). **Normalização bibliográfica para documentos eletrônicos**. E-mail para BECCALLI, A. (beccalli@npd2.ufes.br) [Acesso em 18 mar. 1997].

*Para mensagens pessoais o endereço pode ser omitido.

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

Volume 67 Number 5 November 2001

Surface Charge Properties and Soil Mobilities of Mycoherbicidal Spores by D. J. Daigle,
R. M. Johnson, D. Sands, W. J. Connick, Jr. 617

Preliminary Evaluation of Hair as a Matrix for Monitoring Environmental Exposure
by M. W. Cost, B. C. Lynn, Jr. 625

Use of Biomarkers in Earthworms to Detect Use and Abuse of Field Applications of a Model
Organophosphate Pesticide by L. H. Booth, S. Hodge, K. O'Halloran 633

Effects of Zinc on Brown Fat Thermal Response to Cold in Normal and Triiodothyronine-
Treated Hypothyroid Rats by I. Rebagliati, M. Raíces, C. Ricci, A. Weisstaub, K. Hagmüller,
A. A. Zaninovich 641

In Vivo Inhibition of Multivitamin on the Formation of Hemoglobin Adduct in 4-
Aminobiphenyl-Treated Rat by T. Qin, X. B. Xu, L. X. Zhao, Z. L. Jin 649

Effects of Cypermethrin on Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Liver
and Kidney of the Freshwater Fish, *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* (L.)
by N. Üner, E. Özcan Oruç, M. Canli, Y. Sevgiler 657

Acute Toxicity of the Pesticides Endosulfan and Ametryne to the Freshwater Prawn
Macrobrachium rosenbergii De Man by J. V. Lombardi, J. G. Machado-Neto, A. L. Brossi-Garcia,
H. L. A. Marques, E. Kubo 665

Cytotoxic and Cytoprotective Effects of Selenium on Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*)
Phagocytic Cells *In Vitro* by S. Palchaudhuri, A. Raymond, E. A. Carlson, Y. Li, J. T. Zelikoff
672

Avoidance Response of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* to Heavy Metal Model Mixtures:
A Comparison with Acute Toxicity Tests by G. Svecevičius 680

Interactive Effect of Manganese, Molybdenum, Nickel, Copper I and II, and Vanadium on the
Freshwater Alga *Scenedesmus quadricauda* by A. Fargašová 688

Ecotoxicological Characterization of a Disposal Lagoon from a Munition Plant by J. S. Fuchs,
M. L. Oneto, N. B. Casabé, O. Gómez Segura, R. Tarulla, M. Vaccarezza, C. Sánchez-Rivas,
E. M. Kesten, E. J. Wood 696

Contents continued on back cover

128 BECTA6 67(5) 617-770 (2001) ISSN 0007-4861



Springer

To visit Springer on the Web: <http://www.springer-ny.com>
To e-mail the journal: bect@springer-ny.com



<http://link.springer-ny.com>

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

Instructions to Authors (Revised May 2001)

1. General. Manuscripts must be in English and must not exceed 8 pages, including figures, tables, and references. Papers in this journal are reproduced by photographing the laser-printed manuscript. Authors are expected to recommend the names of two manuscript reviewers not affiliated with the authors' institution or company. It is essential that manuscripts are neatly prepared in accordance with the following instructions.

2. Copyright. Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, or thesis); that it is not under consideration for publication elsewhere; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities at the institute where the work has been carried out; that, if and when the manuscript is accepted for publication, the authors agree to automatic transfer of the copyright to the publisher; that the manuscript will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright holders; that written permission of the copyright holder is obtained by the authors for material used from other copyrighted sources; and that any costs associated with obtaining this permission are the authors' responsibility.

3. Submission. The *original* typescript, original or very clean copies of photographs or line drawings (see size restrictions for both), and two complete copies of each should be sent to the Associate Editor responsible for the review of a particular subject category.

4. Page charges. There are no page charges for this journal.

5. Offprints. Offprints may be ordered from the publisher before the article goes to press. An order form will be sent to the author with the acceptance letter. Please note that free offprints are no longer supplied to authors.

6. Organization of the manuscript. The following sections constitute a *Bulletin* article. Do not submit a manuscript which includes any other section. An abstract and/or conclusion section is not allowed. Boldface type is preferred for headings B, C, and E; italic type is preferred for heading D. *All section headings and text must begin at the left margin.*

A. Introduction. *Do not use a section heading.* One or two paragraphs which concentrate on the relevance of the study to environmental contamination and toxicology suffice for this section.

B. MATERIALS AND METHODS. Do not use subheadings. Do not underline; use all capitals for the section heading.

C. RESULTS AND DISCUSSION. Do not use subheadings. Do not underline; use all capitals for the section heading.

D. *Acknowledgments.* This heading is set in caps and lower case. Acknowledgments appear as a separate paragraph two spaces below the last paragraph of text. Place funding sources and disclaimers under this section. Acknowledgments are generally limited to six lines.

E. REFERENCES. Use all capitals for the section heading. References are single-spaced and appear in alphabetical order. All papers cited *in the text* should be given in parentheses, e.g., (Child 1941; Godwin and Cohen 1969; MacWilliams et al. 1970) except when the author is mentioned, e.g., "and the study of Hillman and Tasca (1977)." References must be limited to one page.

References to unpublished works and personal communications should be kept to a minimum and mentioned only italicized in the text itself in parentheses. References to published works as given at the end of the text under the first author's name, citing all authors (surnames followed by initials throughout; do not use "and") according to the following examples:

Periodicals:

Blair HC, Kahn AJ, Crouch EC, Jeffrey JJ, Teitelbaum SL (1986) Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J Cell Biol* 102:1164-1172

Cox KH, Delon DV, Angerer LM, Angerer RC (1984) Detection of mRNA in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol* 101:485-502

Witte ST, Will LA, Olsen CR, Kinker JA, Miller-Graber P (1993) Chronic selenosis in horses fed locally produced alfalfa hay. *J American Vet Med Assoc* 202:406-409

Books:

Yaron B, Calvet R, Prost R (1996) Soil pollution. Springer-Verlag, New York

Work in an edited collection:

Letey J (1985) Relationship between soil physical properties and crop production. In: Stewart BA (ed) *Advances in Soil Science*, vol 1. Springer-Verlag, New York, p 277

References by the same author(s) are arranged chronologically. If more than one reference by the same author(s) published in the same year are cited, use a, b, c, etc., after the year of publication in both text and list.



7. Technical preparation of the manuscript.

A. Manuscript must not exceed eight pages, and should be output single-spaced on good quality DIN A4 215 × 278 mm (8½ × 11") white 20 lb. bond paper. Use a word processing program if available. The typefont must be of sufficient size to withstand the 13% page reduction. Twelve-point Times Roman typeface is preferred. Correction fluids are not allowed.

B. Spacing and general style. *Do not indent paragraphs.* Double space between paragraphs, section heads, and/or figure legends, and table captions. Authors are encouraged to refer to a recent issue of the *Bulletin* for the general format. Use Webster's Third New International Dictionary of the English Language, Unabridged, for spelling and hyphenation.

C. Title page. Put on separate page, unnumbered, with double spacing between the following four items: article title, authors, affiliations, and "Correspondence to" author's name. Supply (1) title (capitalizing the first letter of nouns, verbs, and adjectives); (2) author(s); (3) affiliation(s) with complete addresses of all authors; and (4) corresponding author's name, phone number, fax number, and e-mail address. (PHONE AND FAX NUMBERS AND E-MAIL ADDRESS ARE VITAL FOR TIMELY PUBLICATION.) Provide information for correspondence only when there is more than one author. This should be typed as an unnumbered footnote at the bottom of the title page. The format is:

Correspondence to: (name)

or, if mailing address is different than affiliation provided,

**Present address:* (address)

Correspondence to: (name)

D. First page. The first page must be 14 × 16.5 cm (5½ × 6½"). Number this page "1" lightly in *light blue pencil* in the lower right corner.

E. Remaining pages. The text area of each page, including tables and figures, *must not* exceed 14 × 23 cm (5½ × 9"). Utilize the full space available, but do not type beyond the text area. Number each page lightly in *light blue pencil* in the lower right corner.

F. Tables and figures should be typed to fit within the text area (14 × 23 cm or 5½ × 9"), and must appear prior to the reference section. Figures must be placed *at the top* of a text page. Submit original line drawings or photographs; they should be drawn and/or labeled clearly to withstand the 13% page reduction. Mount photographs from the back; marks from tape placed on the front of a photograph will appear on the reproduced photograph. Figure and table numbers should be boldface if possible. The caption texts must be lightface. For instance: **Table 2.** Recoveries at different levels.

Double-space between figure legends and table captions (which are single-spaced and must appear immediately below the figure and above the table) and the typewritten text. Tables may appear lengthwise on a single page if necessary; figures may appear lengthwise on a page if they are greater than 14 cm (5½") in width.

G. Footnote numbers. These numbers in text should be typed above the line (superscript). Footnotes should be single-spaced at the bottom of the appropriate page and separated from the text by a short line immediately above. Avoid footnotes, if possible.

H. Symbols not found on word processing programs may be inserted by hand in *black* ink from a fine-tip pen. Do not use felt-tip pens or pencils.

I. **Camera-ready warning.** The publisher will not make any corrections or adjustments to the laser-printed pages. Any smears, smudges, or fading print on the original will necessitate further revision by the author.

J. Abbreviations

A	acre	m	meter(s)	mM	millimolar
bp	boiling point	ppb	parts per billion	min	minute(s)
cal	caloric	ppm	parts per million	M	molar
cm	centimeter(s)	ppt	parts per trillion	mon	month(s)
cu	cubic (as in "cu m")	pg	picogram	ng	nanogram(s)
d	day	lb	pound(s)	N	normal
ft	foot (feet)	psi	pounds per square inch	no.	number(s)
gal	gallon(s)	rpm	revolutions per minute	od	outside diameter
g	gram(s)	sec	second(s)	oz	ounce(s)
ha	hectare	μg	microgram(s)	sp gr	specific gravity
hr	hour(s)	μL	microliter(s)	sq	square (as in "sq m")
in.	inch(es)	μm	micrometer(s)	vs	versus
id	inside diameter	mg	milligram(s)	wk	week(s)
kg	kilogram(s)	mL	milliliter(s)	wt	weight
L	liter(s)	mm	millimeter(s)	yr	year(s)
mp	melting point				